

論文内容要旨

Acyl-CoA synthetase 6 regulates long-chain polyunsaturated fatty acid composition of membrane phospholipids in spermatids and supports normal spermatogenic processes in mice

学位申請者氏名：宋倉 匡祐

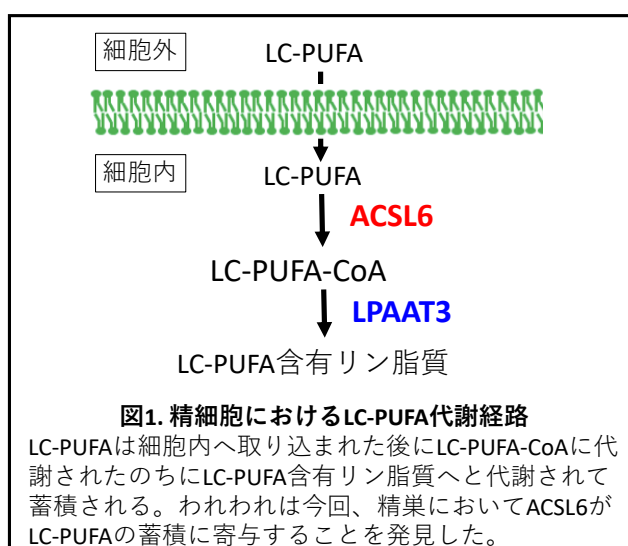
研究指導教員：有田 誠

1. 序

docosahexaenoic acid (DHA)¹⁾やdocosapentaenoic acid (DPA)²⁾などの長鎖多価不飽和脂肪酸 (long chain polyunsaturated fatty acid: LC-PUFA)³⁾は神経組織、網膜、精巣など特定の臓器に膜リン脂質の形で他の臓器に比べ多く存在している。近年このLC-PUFA含有リン脂質自体がこれらの臓器の正常な生理機能発揮に必須であるということが明らかになりつつある[1]。

細胞内に取り込まれたLC-PUFAはLC-PUFA-CoAに代謝されて初めてLC-PUFA含有リン脂質の合成に使用される(図1)。これまでにリゾリン脂質アシル転移酵素の一種であるLpaat3がDHA—CoAを基質にDHA含有リン脂質の形成と正常な精子形成に必須であることが示されていた[2]。

一方で、Long-chain acyl-CoA synthetase(ACSL) の一種であるACSL6が in vitroでLC-PUFAを基質にすること、そして脳や精巣などLC-PUFAを多く含有する臓器に特徴的に発現していることから、Lpaat3の上流で臓器LC-PUFA蓄積に寄与している可能性が考えられた[3]。そこで我々はこの可能性とLC-PUFA蓄積の生理学的意義を解明するためにACSL6欠損マウスを作成し表現型解析を行い、ACSL6が精巣におけるDHA/DPAの選択的な臓器蓄積と雄性生殖に必要であることを明らかにした。

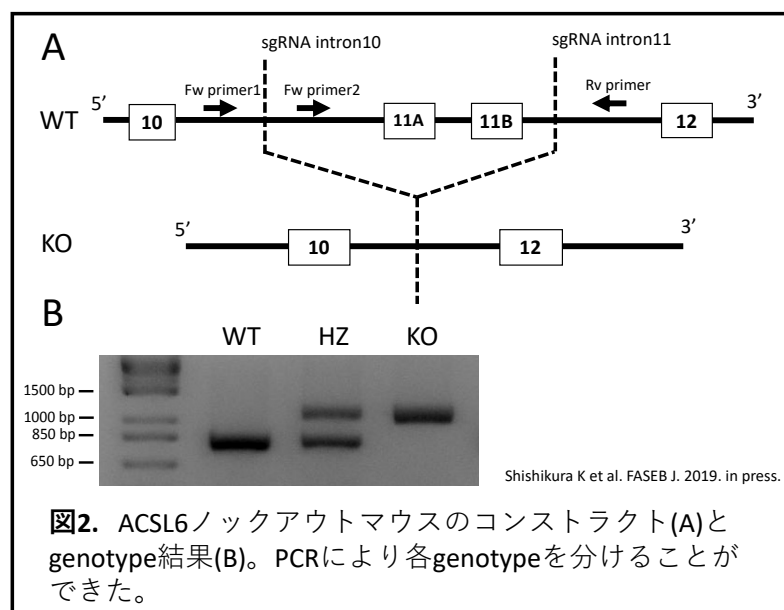


2. 実験方法

【1. ACSL6欠損マウスの作製】

これまでACSL6の11番エキソンにコードされるアミノ酸領域がAcsl6の酵素活性に必須である[4]。そこで、10番と11番イントロン領域のPAM配列を含む部分をそれぞれターゲットにし、sgRNAを計2つ作成した。C57BL/6Jの受精卵の細胞質に2種のsgRNAとCas9 RNAを注入の上、

メスのマウスの子宮に着床・発生させた。ジェノタイピングは2つのforward primerと1つのreverse primerを用いて行った(図2A)。野生型アレルからはforward primer 2のPCR産物(826 bp)が、ノックアウトアレルからはforward primer 1のPCR産物(1114 bp)が複製されるようにPCR条件を設定し、野生型(WT)、ヘテロ(HZ)、ノックアウト(KO)マウスを区別した(図2B)。



【2. 脂質抽出・解析】

等重量の精巣もしくは細胞をホモジネートし、メタノール：クロロホルム：水= 2: 1: 0.2の比率の溶媒で一相抽出した。脂質解析は、四重極型MSと飛行時間型MSをタンデムに繋いだ四重極飛行時間型LC-MS/MS (ACQUITY UPLC I-Class; Waters / Triple TOF 6600; Sciex)によるInformation Dependent Acquisition (IDA) モードで行った。LCシステムには、逆相カラムであるACQUITY BEH C18カラム(粒子径1.7 μ m)を適用し、移動相は、メタノール：アセトニトリル：水=1:1:3とイソプロパノールにそれぞれ酢酸アンモニウム 5 mM、EDTA 10 nMを添加した二液混合型グラジエントを使用し、ネガティブイオンモードおよびポジティブイオンモードで測定した。

【組織中のACS活性測定】

精巣をbuffer1 (0.25 M sucrose, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM DTT, and protease inhibitor cocktail) 中でホモジネートし未破碎の細胞を除いたのちに100,000 gで遠心し総膜画分を得た。この画分1 μ g protein相当を100 μ Lの基質を含有したbuffer2 (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 8 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1mM NaF, 1 mg/mL BSA, 2.5 mM ATP, 0.5 mM CoA, 2.5 μ M パルミチン酸, 2.5 μ M アラギドン酸, 2.5 μ M DPA, and 2.5 μ M DHA)内で37°C, 4分反応させた。産生されたアシル-CoAはLC-MS/MS (ACQUITY UPLC I-Class; Waters / Triple Quad 6500; Sciex)のMRMモードで測定

した。LCシステムには、逆相カラムであるYMC-triart (粒子径1.8 μm)を適用し、移動相はメタノール：アセトニトリル：水=1:1:3とイソプロパノールにそれぞれ酢酸アンモニウム 5 mM、EDTA 500 nM、アンモニア 0.025%を添加した二液混合型グラジエントを使用した。MSではポジティブイオンモードでアシルCoAの脂肪酸特異的なフラグメントを用いて定量した[5]。定量には17:0-CoAを内部標準として使用した。

【3精巣の細胞単離・精製】

分化途中のマウス精細胞である、spermatogonia (SG)、spermatocyte (SC)、Round spermatid (RS)、Elongated spermatid (ES)⁴⁾を解析するためflowcytometer (BD FACS Aria) による細胞の単離を行った。精巣を1 mg/mL コラゲナーゼ処理の上、0.25 % trypsinと1 mg/mL DNase type Iで分解し単細胞浮遊液を作成した。単細胞浮遊液を40 μm cell strainerでろ過し、2.5 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342と1 $\mu\text{g/mL}$ propidium iodide (PI)で染色した。細胞はBD FACS Aria flow cytometerで、PIで死細胞除去、hoechst 33342による倍数体の選別、前方・側方散乱光、さらにはhoechstのside populationを用いたゲーティングを行い単離した。

【4. 精巣上体からの精子の単離・体外受精】

ACSL6 HZもしくはKOマウス雄の精巣上体に切り込みを入れたのちに精子をピンセットで絞り出しHTF培地中で5% CO₂、37°Cの条件で1時間培養した。卵子を得るためにWTの雌マウスに妊馬血清性性腺刺激ホルモン8.3 IU腹腔内投与し、48時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン8.3 IU腹腔内投与し過剰排卵させ、さらに15時間後に卵管を採取して得た。サンプル間で同じ濃度の精子を卵子とHTF培地で5時間培養し受精させた。受精卵は前核⁵⁾の有無で判断し、受精率を計算した。

【5. 精巣のHE染色・TUNEL染色】

マウス精巣をDavidson固定液に室温で24時間浸漬固定しパラフィン包埋した。サンプルは5 μm の厚さに薄切したのちHematoxylin-Eosin染色を行った。精巣内のアポトーシス検出のためのTUNEL染色はIn Situ Cell Death Detection Kit (Sigma)のプロトコールに従って行った。

【6. 精巣のトリイジンブルー染色・電子顕微鏡】

マウスの左心室からPBSを注入し脱血し2.5% グルタルアルデヒド/0.2M リン酸緩衝液で還流固定を行った。固定組織はエポン包埋の後、4 μm の厚さに薄切したのちトリイジンブルーで染色した。電子顕微鏡に関して、グルタルアルデヒド固定した組織を2%酸化オスミウムで4°Cで2時間固定した。エタノール脱水したのち、プロピレオキシド置換しエポン包埋した。包埋後、ウルトラミクロトームで0.2 μm に薄切し、0.4 %酢酸ウラン、鉛で染色後に電界放出形走査電子顕微鏡 (Field Emission-Scanning Electron Microscope (FESEM)) (SU8220) ⁶⁾で撮影した。

3. 実験結果

【1. *ACSL6* KOマウス精巣の脂質解析】

マウスをHZ同士で交配させるとWT、HZ、KOマウスがほぼメンデル比で生まれることから明らかな胎生致死は認めないにも関わらず、KOマウスの雄をWTの雌と交配させると全く子供が生まれなかった。このことから*ACSL6* KOマウスは雄性の不妊であることが示唆された。*Acsl6*は精巣に高発現していることから脂質解析を行うと、*ACSL6* KOマウスの精巣ではDHA (22:6, n-3) およびDPA (22:5, n-6) 含有リン脂質の有意な減少が認められた。精巣の膜たんぱく質画分を用いて組織でのAcyl-CoA合成能を評価するとKOマウスでDHA/DPA選択的にAcyl-CoA合成能の低下を認めた。このことから*Acsl6*は精巣でDHA/DPA-CoA合成を介してDHA/DPA蓄積に関与することが示唆された。次に精細胞をフローサイトメーターで分離し、各分化細胞集団における*ACSL6*の遺伝子発現を調べると、分化途中の精細胞であるSC, RSにおいて顕著な*ACSL6*の発現を認めた(図3A)。単離した精細胞の脂質を測定すると*ACSL6* KOマウスのSC, RS, ESといった分化後期の精細胞においてDHA,DPA含有リン脂質の減少が認められた(図3B)。

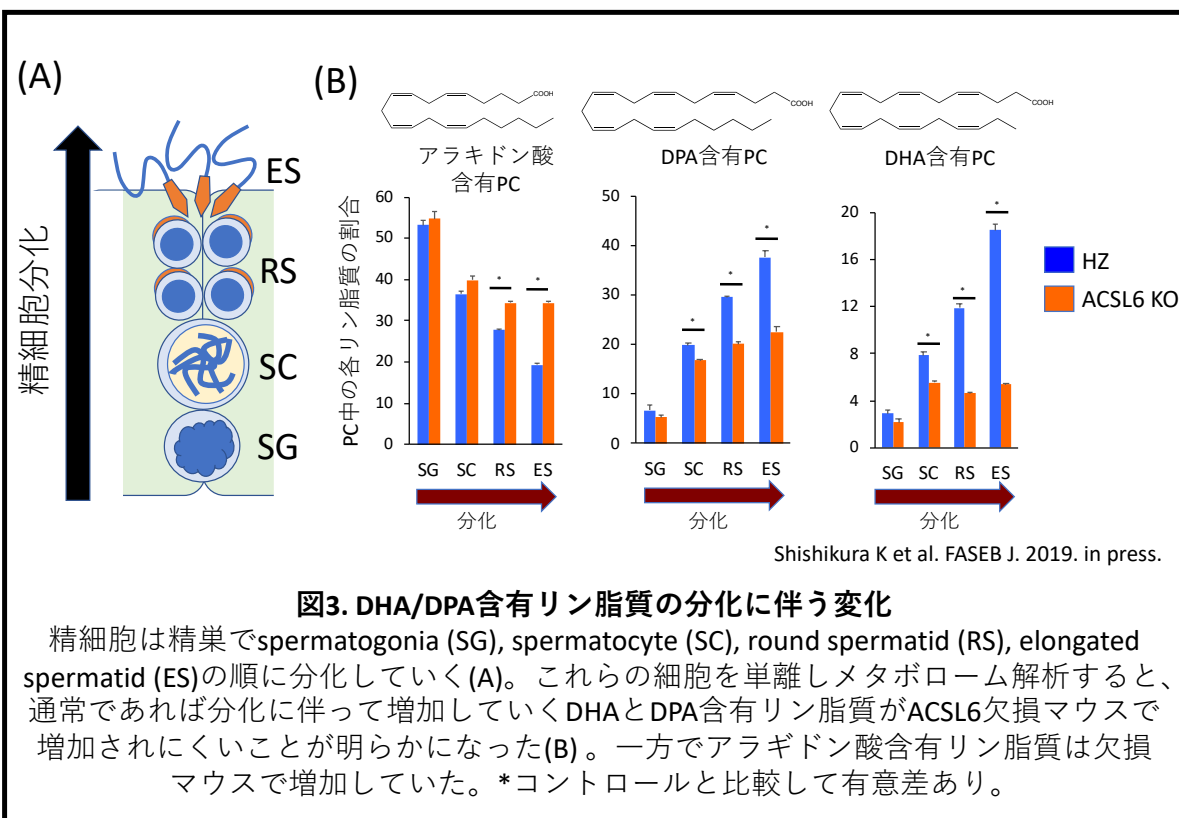


図3. DHA/DPA含有リン脂質の分化に伴う変化

精細胞は精巣でspermatogonia (SG), spermatocyte (SC), round spermatid (RS), elongated spermatid (ES)の順に分化していく(A)。これらの細胞を単離しメタボローム解析すると、通常であれば分化に伴って増加していくDHAとDPA含有リン脂質が*ACSL6*欠損マウスで増加されにくいことが明らかになった(B)。一方でアラキドン酸含有リン脂質は欠損マウスで増加していた。*コントロールと比較して有意差あり。

【2. 表現型解析】

個体レベルの生殖能力は精子の数と個々の精子の受精能によって規定される。精子が蓄えられている精巣上体から精子を単離し精子数の定量と観察を行うと、著明な精子数の低下と異常形態をもつ精子を多く認めた(図4)。精子の受精能を評価する体外受精を行うと、コントロールと比較してKOマウスで体外受精成功率の低下を認めた。このことから*ACSL6* KOマウスは精子数と精子の受精能の両方の低下に起因する不妊である可能性が考えられた。

次に精巣組織の形態について詳細に解析した。まず、*ACSL6*KOマウスの精巣は形状や組織重量の明らかな差をコントロールと比較して認めなかった。またフローサイトメーターを用いて各分化段階（SG, SC, RS, ES）の精細胞の割合を比べると明らかな差が検出されず、分化過程の異常は示唆されなかった。一方で、分化が終了した精細胞であるESを強く描出するトルイジンブルー染色を行うと、本来であれば放出されているはずのESが放出されずに管腔側に多くとどまっていることを見出した。電子顕微鏡でESの微細構造を描出すると、KOの精細管管腔で小胞に覆われた異常ESの存在を多数認めた。アポトーシスを検出するTUNEL染色で染色すると多数のKOマウスのESでTUNEL陽性となり、ESが細胞死を起こしていることが確認された。以上のことから*ACSL6*KOマウスの精子形成不全の原因は精巣での精子放出の遅延とESのアポトーシスであることが示唆された。

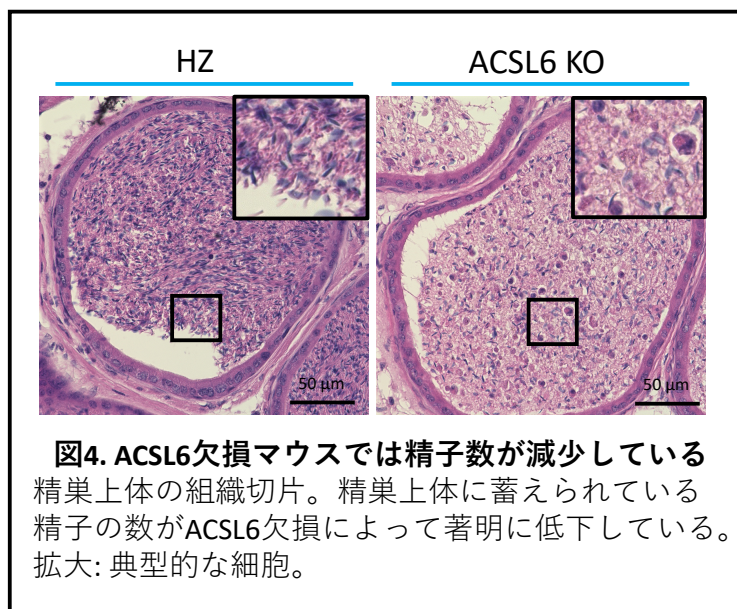


図4. *ACSL6*欠損マウスでは精子数が減少している精巣上体の組織切片。精巣上体に蓄えられている精子の数が*ACSL6*欠損によって著明に低下している。拡大: 典型的な細胞。

4. 討論

長鎖脂肪酸は細胞質で*ACSL*によってアシルCoAに変換され、リン脂質の合成に利用される（図1）。我々は*ACSL6*KOマウスの精巣の解析を通して、*Acsl6*は分化途中の精細胞でDHA/DPA含有リン脂質の蓄積に関与するとともに、正常な精子形成に必須であることを見出し今回英文誌に発表した（Shishikura K et al. *FASEB J.* in press.）。これまで分化過程の精細胞ではDHA-CoAからDHA含有リン脂質を合成する酵素である*Lpaat3*が高発現し、そのKOマウスの精巣ではDHA含有リン脂質の選択的低下と精巣での精子放出遅延と精子の形成不全を呈することから、精子形成においてn-3脂肪酸のDHA含有リン脂質が重要とされている[6]。*ACSL6*KOマウスの表現型は精細胞のDHA含有リン脂質が低下する*LPAAT3*KOマウスと共通する表現型を呈するものの、著明な精子数の減少とESのアポトーシスを伴うという点でより重度の表現型であった。このことはDHA含有リン脂質以外にも精子形成において重要な脂質代謝が存在する可能性を示唆している。

論文準備中に海外の別のグループより報告された*ACSL6*KOマウスの脳のリピドミクス解析ではDHA含有リン脂質の選択的低下を認めていた[7]。この同一遺伝子欠損による影響が臓器によって異なる点は、脂肪酸輸送体やリゾリン脂質アシル転移酵素といった*ACSL6*以外の脂肪酸蓄積経路に起因する可能性がある[2, 8]。また、*ACSL6*KOマウスの雄性不妊の表現型については、ほぼ同時期に報告された論文においても支持されている[9]。

5.まとめ

1) *ACSL6* KOマウスの精巣においてDHA/DPAに対する酵素活性の低下とDHA/DPA含有リン脂質の低下が認められた。

2) *Acs16*は分化途中の精細胞 (SC, RS) に高発現し、分化に伴う精細胞内へのDHAとDPAの蓄積に寄与していると考えられた。

3) *ACSL6* KOマウスでは、分化が終了した段階のelongated spermatidの放出の異常と細胞死によって精子の数と受精能に異常を来し、雄性不妊の表現型を示した。

6. 今後の研究計画

今後は*ACSL6* KOマウスの精巣の表現型の分子メカニズムをさらに検証していく予定である。とくにDHA/DPAがどのように精子形成に寄与しているのかを分子レベルで明らかにしていきたい。

7. 論文リスト

主論文

1. Shishikura K, Kuroha S, Matsueda S, Iseki H, Matsui T, Inoue A, Arita M. Acyl-CoA synthetase 6 regulates long-chain polyunsaturated fatty acid composition of membrane phospholipids in spermatids and supports normal spermatogenic processes in mice. *FASEB J.* 2019 Dec;33(12):14194-14203.

8. 参考論文等

- [1] Spector AA1, Kim HY. Discovery of essential fatty acids. *J Lipid Res.* 2015 Jan;56(1):11-21.
- [2] Hishikawa D, Valentine WJ, Iizuka-Hishikawa Y, Shindou H, Shimizu T. Metabolism and functions of docosahexaenoic acid-containing membrane glycerophospholipids. *FEBS Lett.* 2017 Sep;591(18):2730-2744.
- [3] Lee EJ, Kim HC, Cho YY, Byun SJ, Lim JM, Ryoo ZY. Alternative promotion of the mouse acyl-CoA synthetase 6 (mAcsl6) gene mediates the expression of multiple transcripts with 5'-end heterogeneity: genetic organization of mAcsl6 variants. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Feb 4;327(1):84-93.
- [4] Soupene E, Dinh NP, Siliakus M, Kuypers FA. Activity of the acyl-CoA synthetase ACSL6 isoforms: role of the fatty acid Gate-domains. *BMC Biochem.* 2010;11:18.
- [5] Neubauer S, Chu DB, Marx H, Sauer M, Hann S, Koellensperger G. LC-MS/MS-based analysis of coenzyme A and short-chain acyl-coenzyme A thioesters. *Anal Bioanal Chem.* 2015 Sep;407(22):6681-8.
- [6] Iizuka-Hishikawa Y, Hishikawa D, Sasaki J, Takubo K, Goto M, Nagata K, et al. Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells by

incorporating docosahexaenoic acid during spermatogenesis. J Biol Chem. 2017;292(29):12065-76.

[7] Fernandez RF, Kim SQ, Zhao Y, Foguth RM, Weera MM, Counihan JL, Nomura DK, Chester JA, Cannon JR, Ellis JM. Acyl-CoA synthetase 6 enriches the neuroprotective omega-3 fatty acid DHA in the brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Dec 4;115(49):12525-12530.

[8] Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh EL, Silver DL. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. Nature. 2014 May 22;509(7501):503-6.

[9] Hale BJ, Fernandez RF, Kim SQ, Diaz VD, Jackson SN, Liu L, Brenna JT, Hermann BP, Geyer CB, Ellis JM. Acyl-CoA synthetase 6 enriches seminiferous tubules with the ω -3 fatty acid docosahexaenoic acid and is required for male fertility in the mouse. J Biol Chem. 2019 Sep 27;294(39):14394-14405.

9. 用語集

*1). docosahexaenoic acid (DHA): 脂肪酸メチル末端から 3 番目の炭素に二重結合を有する n-3 脂肪酸の一つで哺乳類の生体内で de novo 合成することができない

*2). docosapentaenoic acid (DPA): 脂肪酸メチル末端から 6 番目の炭素に二重結合を有する n-6 脂肪酸の一つで哺乳類の生体内で de novo 合成することができない

*3). long chain polyunsaturated fatty acid: LC-PUFA: 二重結合を複数有する脂肪酸の総称。

*4). spermatogonia (SG)、spermatocyte (SC)、Round spermatid (RS)、Elongated spermatid (ES): 分化過程の精細胞の名前。精子形成過程において精細管の基底膜上に存在する精子の幹細胞 spermatogonia (SG)が 4 倍体の spermatocyte (SC)に分化したのち 2 回減数分裂を繰り返し、半数体の Round spermatid (RS)が形成される。その後 RS が大きな形態変化を遂げて尾やかぎ爪状の頭部を有する Elongated spermatid (ES)へ分化し精子として放出される。

*5). 前核: 受精卵にのみに認められる特徴的な核。卵子の受精が成功した場合、卵子由来の核と精子由来の核が合計 2 つはっきりとした形で確認される。

*6). Field Emission-Scanning Electron Microscope (FESEM): 電子銃に電界放出形電子銃を用いた SEM。従来の熱電子銃を用いる汎用 SEM と比較して電子ビームを細く収束させることができるためより高倍率での観察が可能で切片の撮影において Transmission Electron Microscope (TEM)と比べて分解能は劣るものの、サンプルを一回の撮影で破壊することなく繰り返しの撮影が可能のため使いやすい。